

# UJI TOKSISITAS ZAT WARNA AZO TURUNAN O-DIANISIDIN TERHADAP *SACCHAROMYCES CERREVISIAE* SEBAGAI MODEL UJI EKOTOKSIKOLOGIS

## *Toxicity Test of O-dianisidine Azo Dyes to Saccharomyces cerevisiae as A Model Ecotoxicological Test*

Christine Patramurti<sup>1</sup>, Sardjoko<sup>2</sup>, Sri Noegrahati<sup>2</sup>

Program Studi Ilmu Farmasi

Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

### ABSTRACT

O-dianisidine azo dyes are used in coloring processes of Indonesian batik industries. The toxicity of azo compound is defined by its degradation, i.e. amine aromatic compound, nevertheless the toxicity of its parent compound is still unknown. There are possibilities to describe ecotoxicological interactions of xenobiotic using QSAR-model. The aim of this study is having more information of cause-effect relationship of xenobiotic o-dianisidine azo dyes toward *Saccharomyces cerevisiae*, as an eucaryotic model.

The experiment begin with lipophilicity parameter determination ( $\log k_{\text{octanol/water}}$  and  $\log k_{\text{paraffine/water}}$ ), followed by ecotoxicological parameter ( $EC_{50}$ ). The determination of lipophilicity was carried out in two ways; first, it using calculation based on the concept of additivity group contribution, developed by Leo-Hansch, to obtain its  $\log k_{\text{octanol/water}}$ ; second determination was carried in RPTLC (reversed phase thin layer chromatography) using paraffine as stationary phase and mixtures of aseton-water as mobile phase, to obtain  $\log k_{\text{paraffine/water}}$ .  $EC_{50}$  was obtained by measuring and calculating 50% *Saccharomyces cerevisiae* growth rate inhibition. Meanwhile, the possibilities of azo dyes degradation was studied with or without *Saccharomyces cerevisiae*.

The calculated  $\log k_{\text{octanol/water}}$  of o-dianisidine azo dyes studied was 13 to 14, therefore it is considered as superhydrophobic compound and has difficulties to pass the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*; nevertheless, it has  $EC_{50}$  of 140 to 150 ppm. No degradation in media without *Saccharomyces cerevisiae* was observed, but there is azo dyes concentration decrease in the media containing *Saccharomyces cerevisiae*. The study on the cause of the decreasing concentration revealed that physically adsorption of azo dyes on the cell of *Saccharomyces cerevisiae* occurred, according to Langmuir-Hinshelwood adsorption kinetics with  $k_1 = 5.67 \times 10^{-3}$  to  $6.79 \times 10^{-3}$  mol/sec and  $E_{\text{ads}} = 19.23$  to  $19.75$  kJ/mol. The evidence of physical adsorption was supported by the small CF value = 0.46 to 0.78. The azo dyes prefer to dissolved in organic solven, showed by  $\log k_{\text{paraffin/water}}$  between 3 - 4. Therefore, there is a linier correlation between  $\log k_{\text{paraffin/water}}$  with  $EC_{50}$  ( $Y = -17.84X + 220.55$ ). This correlation can be used to explain the dermatitis reaction on skin too.

Keywords: Ecotoxicological,  $EC_{50}$  adsorption, azo dye, QSAR, lipophilicity

## PENGANTAR

Zat warna azo turunan o-dianisidin adalah zat warna sintesis yang digunakan pada pewarnaan kain batik. Zat warna ini diperoleh dari hasil reaksi antara senyawa turunan  $\beta$ -naftol dengan garam o-dianisidin. Pada umumnya toksistas zat warna azo ditentukan oleh terbentuknya senyawa amin aromatis, hasil degradasi zat warna azo (Benya & Cornish, 1994). Namun, toksisitas dari zat warna azo sendiri belum banyak diketahui.

Pada beberapa tahun terakhir ini, telah banyak dikembangkan studi **Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA)** dalam berbagai bidang, termasuk di bidang ekotoksikologi. Dalam bidang ini, studi HKSA antara lain digunakan untuk memprediksi hubungan antara struktur xenobiotik, diwakili oleh parameter lipofilisitas, dengan efek yang ditimbulkan akibat terjadinya interaksi antara xenobiotik dengan biota di lingkungan, diwakili oleh parameter  $EC_{50}$  (Koch, 1983). Untuk mengetahui adanya hubungan ini, maka pada penelitian ini akan dipelajari sifat-sifat fisika kimia dari beberapa zat warna azo turunan o-dianisidin, serta pengaruhnya terhadap biota lingkungan, yang dalam hal ini digunakan jamur *Saccharomyces cerevisiae* sebagai model sel eukariotik.

## CARA PENELITIAN

Bahan penelitian yang digunakan meliputi garam o-dianisidin, beberapa turunan  $\beta$ -naftol naftol, yaitu: naftol AS, naftol AS-D, naftol AS-BO, naftol AS-BS, naftol AS-LB serta naftol AS-OL (Balai Batik Yogyakarta) yang semuanya berkualitas teknis.

Bahan untuk penetapan parameter lipofilisitas adalah akuades (Laboratorium Kimia Analisis, FMIPA UGM), Lempeng Kromatografi Silikagel GF250, Parafin cair, Aseton, n-Heksan (E Merck, Darmstadt) yang semuanya berkualitas pro-analisa.

Bahan untuk penetapan parameter aktivitas toksik adalah akua-bides (Laboratorium Kimia Analisis, FMIPA UGM), glukosa, Agar no.1 (Oxoid, Sydney), Ekstrak Yeast, Pepton (Difco Laboratories, Sydney), Dimetilsulfoksid, Kloroform (E Merck, Darmstadt) yang kesemuanya berkualitas pro-analisa.

Subjek uji penelitian ini adalah *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26400

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat pemusing (Kokusan H-100 BC, Tokyo), Bejana Kromatografi, pipa kapiler, detektor lampu uv, pipet mikro (Model 5000 DG, Nichiryo), neraca (Mettler AB 204, Toledo), Oven, Autoklave, Ultrasonikator, Laminar Air Flow, Counting Counter, Haemocytometer (Neubauer improved, bright line), Mikroskop Olympus (Olympus CH-2, Jepang), Spektrofotometer (Spectronic 21D, Milton Roy), komputer dilengkapi printer CANON BJC-210 SP, perangkat lunak untuk penghitungan log P menurut Leo-Hansch (Laboratorium Kimia Komputasi, FMIPA UGM)

Dalam penelitian ini juga digunakan seperangkat alat gelas yaitu labu takar 250 ml, 50 ml, 10 ml, Erlenmeyer 100 ml, Pipet volume 10 ml, corong pisah 100 ml, cawan petri, gelas beker, serta batang pengaduk.

**Pembuatan zat warna azo.** Zat warna azo yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari reaksi antara garam o-dianisidin dengan senyawa turunan b-naftol. Pada penelitian ini digunakan enam macam senyawa turunan b-naftol, perbedaan struktur b-naftol akan menyebabkan perbedaan struktur molekul zat warna azo.

Penetapan sifat fisika kimia zat warna. Pada percobaan ini masing-masing zat warna azo yang digunakan pada penelitian ini dilarutkan dalam beberapa macam pelarut, yaitu air, metanol, aseton, DMSO, kloroform dan n-heksan. Parameter lipofilik ditentukan dengan dua macam cara, yaitu dengan cara hitungan menurut Leo - Hansch dan dengan metode KLT fase terbalik (fase diam : parafin dan fase gerak : campuran aseton : air)

Penetapan parameter ekotoksikologis dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemungkinan terjadinya penurunan kadar zat warna, dengan atau tanpa adanya sel khamir.

Penentuan parameter  $EC_{50}$  dilakukan dengan mengamati pengaruh penambahan zat warna azo pada pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*.

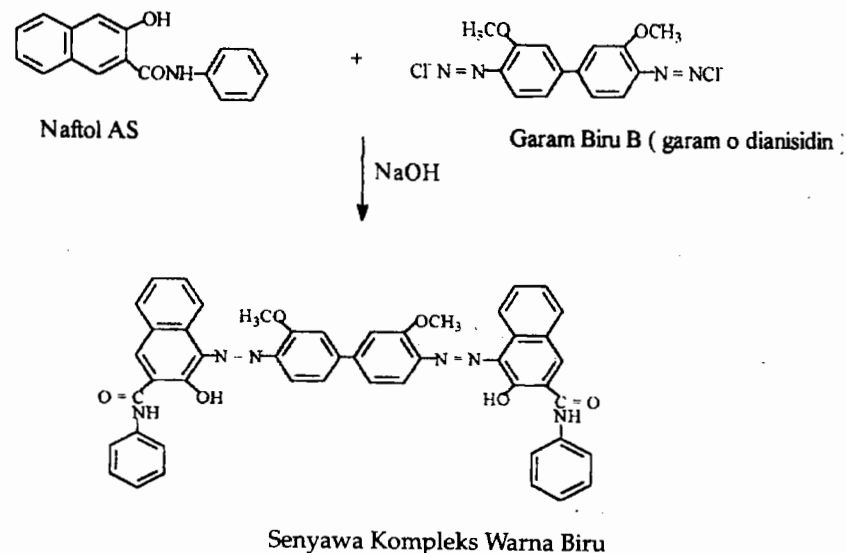
Penentuan Parameter CF dihitung dengan membandingkan kadar zat warna yang ada di dalam sel dengan yang ada di luar sel khamir.

Evaluasi Data. Berdasarkan data yang diperoleh, kemudian dilakukan evaluasi terhadap fenomena efek ekotoksikologis zat warna azo turunan o-dianisidin.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pembuatan zat warna azo

Zat warna azo yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari reaksi antara garam o-dianisidin dengan senyawa turunan b-naftol. b-naftol. Reaksi yang terjadi antara naftol AS dengan garam o-dianisidin adalah sebagai berikut :



Gambar 1. Reaksi antara naftol AS dengan garam o-dianisidin

Pada penelitian ini digunakan enam macam senyawa turunan b-naftol untuk mendapatkan zat warna azo. Perbedaan senyawa  $\beta$ -naftol yang digunakan akan menyebabkan perbedaan struktur molekul zat warna azo.

### Penentuan sifat fisika kimia zat warna

#### a. Kelarutan zat warna

Berdasarkan hasil pengamatan, maka dapat disimpulkan bahwa keenam zat warna azo yang digunakan mempunyai pola kelarutan yang hampir sama; yaitu cenderung lebih larut dalam pelarut non polar. Oleh karena itu jika zat warna ini masuk ke dalam lingkungan (perairan), maka zat warna akan mengendap, teradsorpsi dalam sedimen serta membentuk *suspended solid* yang stabil.

#### b. Parameter lipofilik

1) Parameter  $\log P_{\text{hitung}}$ . Penentuan  $\log P_{\text{hit}}$  ini dilakukan dengan menggunakan program Clog P menurut Leo-Hansch yang ada di laboratorium MIPA Kimia UGM. Parameter ini diperoleh berdasarkan harga koefisien partisi dari senyawa dalam sistem oktanol-air. Oleh karena itu, untuk selanjutnya parameter  $\log P_{\text{hit}}$  dinyatakan sebagai  $\log k_{(\text{oktanol/air})}$ . Hasil dari perhitungan  $\log k_{(\text{oktanol/air})}$  untuk masing-masing zat warna dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Harga  $\log k_{\text{okt/air}}$  zat warna azo

No	Zat warna azo turunan	$\log k_{\text{okt/air}}$
1.	Naftol AS	13,35
2.	Naftol ASD	13,85
3.	Naftol ASBO	13,60
4.	Naftol ASBS	13,26
5.	Naftol ASLB	12,49
6.	Naftol ASOL	12,69

Pada Tabel 1 tersebut terlihat bahwa urutan lipofilisitas zat warna yang diamati adalah sebagai berikut : ASLB < ASOL < ASBS < AS < ASBO < ASD.

Berdasarkan harga  $\log k_{\text{okt/air}}$ -nya, maka zat warna azo turunan o-dianisidin yang digunakan pada penelitian ini dikategorikan sebagai senyawa super hidrofobik (Nendza & Hermens, 1995).

2) Parameter  $R_{\text{mw}}$ . Parameter  $R_{\text{mw}}$  pada percobaan ini ditentukan dengan metode KLT fase terbalik, fase diam parafin dan fase gerak campuran aseton : air. Parameter  $R_{\text{mw}}$  diperoleh dari hasil ekstrapolasi kurva hubungan antara beberapa perbandingan fase gerak dengan besaran  $R_{\text{m}}$ . Parameter  $R_{\text{mw}}$  ini pada dasarnya menunjukkan besaran yang menggambarkan terjadinya partisi senyawa dalam parafin - air, oleh karena itu untuk selanjutnya parameter  $R_{\text{mw}}$  pada percobaan ini dinyatakan sebagai  $\log k_{(\text{parafin/air})}$  (tabel 2).

### Efek ekotoksikologis zat warna azo

Perilaku suatu senyawa organik di lingkungan, utamanya di lingkungan perairan, sangat bergantung pada sifat-sifat fisika - kimianya, antara lain : lipofilisitas, kelarutan dalam air, tekanan uap serta stabilitas. Lipofilisitas dan kelarutan senyawa dalam air merupakan suatu parameter fisika kimia yang digunakan untuk menjelaskan kecenderungan suatu senyawa untuk berinteraksi dengan partikel-partikel lain (sedimen), serta dengan biota yang ada di lingkungan air.

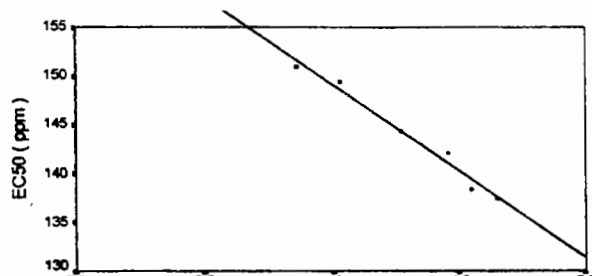
Uji toksisitas beberapa zat warna azo turunan o-dianisidin terhadap *Saccharomyces cerevisiae* pada penelitian ini menunjukkan bahwa interaksi yang terjadi antara zat warna dengan sel khamir bersifat bolak-balik. Jika ditinjau dari segi sel khamir, maka adanya zat warna akan menyebabkan penghambatan pertumbuhan, dalam hal ini dinyatakan dengan besaran  $EC_{50}$ . Sedangkan dari segi zat warna, maka adanya interaksi antara zat warna dengan sel khamir akan menyebabkan penurunan kadar zat warna; dalam hal ini zat warna akan diadsorpsi oleh dinding sel khamir.

Parameter lipofilisitas yang dinyatakan dengan parameter  $\log k_{(parafin/air)}$  dalam penelitian ini menunjukkan bahwa zat warna azo memiliki kecenderungan untuk lebih larut dalam parafin (fase organik) daripada dalam air. Adanya kenyataan ini, maka dapat difahami jika zat warna azo dapat teradsorpsi pada dinding sel khamir, yang mempunyai sifat lebih apolar dibanding air. Oleh karena itu terdapat hubungan yang linier antara parameter  $\log k_{(parafin/air)}$  dengan parameter  $EC_{50}$  - nya. Hubungan ini secara matematis dituliskan dengan persamaan :

$$Y = -17,84 X + 220,55 \dots\dots\dots (2)$$

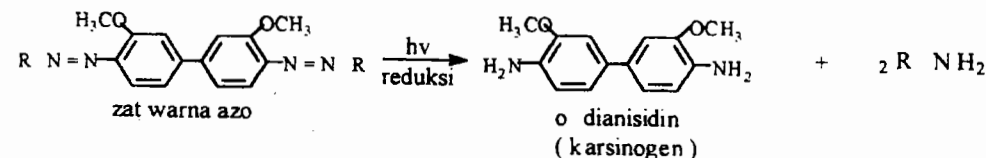
$$(n = 6 ; r = -0,989 ; SE = 0,912)$$

$$(n = 6 ; r = -0,989 ; SE = 0,912)$$



Berdasarkan persamaan 2, maka dapat dibuat suatu prediksi keadaan lingkungan jika tercemar oleh zat warna azo. Adanya cemaran zat warna azo akan menyebabkan gangguan keseimbangan ekosistem, hal ini disebabkan zat warna azo dapat menimbulkan efek toksik terhadap biota alam pendegradasi senyawa organik. Jika jumlah biota pendegradasi berkurang, maka akan terjadi penumpukan cemaran di lingkungan dan hal ini akan membahayakan kehidupan biota lain yang hidup di dalam ekosistem. Keadaan ini diperburuk dengan adanya kenyataan bahwa interaksi antara sel khamir dengan zat warna bersifat fisik, zat warna hanya teradsorpsi oleh dinding sel. Kekuatan ikatan antara zat warna dengan dinding sel adalah lemah, sehingga mudah terlepas dari dinding sel.

Keberadaan zat warna azo dalam bentuk utuh ini di lingkungan, selain akan memberi dampak negatif terhadap ekosistem, juga akan memberikan masalah lain yang cukup serius. Hal ini terutama disebabkan oleh kemungkinan terjadinya reaksi reduksi dari zat warna azo secara abiotik menghasilkan o-dianisidin yang bersifat karsinogen.



Gambar 3. Reaksi reduksi abiotik zat warna azo turunan o-dianisidin

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Zat warna azo turunan o-dianisidin akan menghambat pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*, dengan  $EC_{50}$  berkisar antara 140 -150 ppm.
2. Efek toksik yang ditimbulkan zat warna azo terhadap *Saccharomyces cerevisiae* terjadi karena proses adsorpsi fisik, sesuai dengan model kinetika adsorpsi Langmuir - Hinshelwood, dengan  $E_a = 19,1 - 19,7$  kJ/mol dan laju adsorpsi  $k_1 = 5,7.10^{-3} - 6,8.10^{-3}$  mol/menit.
3. Efek toksik zat warna azo (parameter  $EC_{50}$ ) akan dipengaruhi oleh sifat fisika kimia-nya (parameter  $\log k_{parafin/air}$ ); semakin besar  $\log k_{parafin/air}$  -nya, maka zat warna akan semakin toksik, sesuai persamaan :  
 $EC_{50} = -17,84 \log k_{parafin/air} + 220,55$

## Saran

1. Dilakukan lebih lanjut tentang studi Ekotoksikologis zat warna azo turunan o-dianisidin dengan jumlah senyawa dan biota yang lebih banyak, serta dengan parameter fisika kimia yang lebih lengkap (ukuran partikel, titik lebur, parameter sterik).
2. Dilakukan penelitian tentang pola degradasi zat warna azo turunan o-dianisidin serta aktivitas ekotoksikologi dari senyawa yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Benya, T.J., Cornish, H.H., 1994, Aromatic and Amino Compounds, in *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 4<sup>th</sup> Edition, vol. 2, part B, John Willey & Sons Inc., New York
- Guthrie, T.E., Perry, J.J., 1980, *Introduction to Environmental Toxicology*, Elsevier Science Publishing Co Inc., New York
- Indriati, 1979, *Kimia Cap Celup Batik*, Departemen Perindustrian Sekolah Analisis Kimia Menengah Atas, Bogor
- Jin, X., Bailey, G.W., Lynch, A.T., 1996, *Kinetics of Single and Multiple Metal Ion Sorption Process on Humic Substances*, Soil Science
- Koch, R., 1983, Quantitative Structure - Activity Relationship in Ecotoxicology : Possibilities and Limits, In : Kaiser, K.L.E., *QSAR in Environmental Toxicology, Proceeding of the Workshop on QSAR in Environmental Toxicology*, Reidel Publishing Company, Canada
- Nendza, M., & Hermens, J., 1989, Properties of Chemicals & Estimation Methodologist, In : Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M. (eds), *Risk Assessment of Chemicals*, Kluwer Academic Publishers, London